17-22

动 物 学 研 究 1998, 19 (1): 17—22　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research

公雏鸡糖皮质激素受体与免疫功能的相关性*

潘兴华　王水琴[①]　陈志龙
(成都军区昆明总医院中心实验科　昆明　650032)

585.2.4
5858.31

摘要　研究了用不同剂量(75、50、25、10 mg/kg)RU_{486}阻断公雏鸡糖皮质激素受体1天或连续3天免疫指标变化情况。RU_{486}75和50 mg/kg阻断GR24 h，公雏鸡脾淋巴细胞IL-2、IFN诱生活性和T、B淋巴细胞增殖活性降低($P<0.01$)，外周血淋巴细胞、单核细胞、ANAE+细胞减少($P<0.01$)；胸腺、脾脏、法氏囊的体重比减小($P<0.01$)。每日RU_{486}50 mg/kg连续3天阻断GR功能，上述指标与同剂量RU_{486}阻断GR24 h鸡比较有进一步下降趋势。25和10 mg/kgRU_{486}阻断GR24 h，上述免疫指标无明显变化($P>0.05$)。结果表明，RU_{486}剂量与鸡脾淋巴细胞IL-2、IFN诱生活性和T、B淋巴细胞活性变化呈负相关，提示雏鸡免疫功能与免疫细胞的功能性GR含量成正相关。

关键词　糖皮质激素受体，免疫，公雏鸡，RU_{486}
中图分类号　R392.1

糖皮质激素(GC)对机体具有广泛的生理作用，包括生长、发育、代谢、免疫等。GC的生物学作用是由糖皮质激素受体(GR)介导的，现已搞清了GR的分子结构、理化特性及可能的作用模式等(周洁，1995)。关于GR与免疫系统的关系还没有引起足够重视，但已证实，所有免疫细胞均含有丰富的GR，它所介导的生物学作用对维持免疫细胞的稳定和正常生理功能具有重要意义(Blalock, 1994)。曾勇(1993)认为，GR和免疫系统之间存在着某种联系，GR作为GC免疫调节的桥梁，其数量或功能改变均可能影响免疫功能。为初步弄清GR与免疫功能的关系以及它在内分泌免疫相互调节中的地位和作用，我们采用对GR有特异结合性和高亲和力、但无GC样作用的甾类化合物RU_{486}（Philibert, 1991）阻断20日龄健康公雏鸡GR，研究了部分免疫指标的变化。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

RU_{486}（上海计划生育研究所产品，用12%聚乙烯醇胶体溶液，即PVA，配制成不同浓度)；伴刀豆球蛋白A(ConA)；乙酸豆寇佛波醇(PMA)；淋巴细胞分离液；1640、MEM细胞培养液；α-甲基-D-甘露糖甘(α-MM)；^{3}H-胸腺嘧啶(^{3}H-TdR，中国原子能研究所生产，放

---

* 国家自然科学基金资助项目
① 解放军农牧大学动物医学系
本文 1996-09-27 收到，1997-05-17 修回

化纯度大于95%，放射性浓度1 mci／ml)；闪烁液(2，5-二苯基恶唑5 g，1，4-双-[5-苯基恶唑基-2]-苯0.3 g，无水乙醇200 ml，甲苯800 ml)，酯酶染色液(pH7.6 PBS 89 ml，六偶氮副品红6 ml，1%α-醋酸萘酯2.5 ml、10%氢氧化钠调pH6.0)等。

1.2 实验动物分组与处理

1日龄伊萨褐公雏鸡，购自长春农业科学院。即日于实验室内分笼饲养，供给充足全价饲料和饮水，经20天健康观察无异常后，随机分为Ⅰ—Ⅵ6个组进行实验。其处理方法如下表：

表1 实验动物分组处理与检测指标

Table 1 Animal groups and treatment and test indexes

分组	鸡数(只)	处理①	观察指标
Ⅰ	15	RU_{486} 75 mg／(kg·day) 1次	1. 脾细胞IL-2诱生活性
$Ⅱ_a$	15	RU_{486} 50 mg／(kg·day) 3次	2. 脾细胞IFN诱生活性
$Ⅱ_b$	5	等量PVA 3次	3. T细胞活性
Ⅲ	5	RU_{486} 50 mg／(kg·day) 1次	4. B细胞活性
Ⅳ	5	RU_{486} 25 mg／(kg·day) 1次	5. 外周血白细胞计数
Ⅴ	5	RU_{486} 10 mg／(kg·day) 1次	6. 外周血ANAE+细胞
Ⅵ	15	等量PVA 1次	7. 脾、法氏囊、胸腺体重比

①每24 h一次皮下注射RU_{486}或PVA，末次注射后24 h处死，采取材料检验。

①Inject RU_{486} or PVA subcutaneously and test experimental indexes after last injection for 24 hours.

1.3 脾淋巴细胞IL-2体外诱生活性检测

生物活性检测法(Schnetzler，1983)。制备实验鸡脾淋巴细胞悬液，用1640培养液于40℃、5%CO_2条件下培养细胞(细胞浓度2.5×10^6个／ml，ConA浓度10 μg／ml)24 h，离心收集IL-2诱生上清，-40℃保存待测IL-2活性。按上述方法培养60日龄公鸡脾淋巴细胞48 h，收集活化淋巴母细胞，10 mg／ml的α-MM于40℃保温15 min，用含α-MM20 mg／ml的1640培养液调细胞浓度4×10^6个／ml，该细胞为检测样品IL-2活性的靶细胞。取96孔培养板，每孔加靶细胞悬液50 μl，样品50 μl，每样品设1∶2、1∶4、1∶8、1∶16和1∶32 5个稀释度，每稀释度复3孔，同时设空白和自制参考鸡IL-2样品对照。细胞于40℃、5%CO_2下培养24 h，每孔加入^3H-TdR(20 μci／ml) 50 μl，继续培养24 h，测^3H-TdR掺入量，以3复孔的平均cpm值表示。取样品1∶16稀释孔的cpm值计算结果。

1.4 脾淋巴细胞IFN诱生活性检测

微量病变抑制法(杨贵贞，1993)，按IL-2诱生法诱生IFN样品、对水泡性口炎病毒(VSV)进行中和效价测定。用96孔板制备10日龄鸡胚传代成纤维细胞、用MEM培养液在培养板上进行样品连续2倍稀释，每稀释度设2复孔，同时设自制参考鸡IFN对照、细胞对照和VSV对照。细胞置于37℃、5%CO_2下培养18 h，用MEM培养液洗涤细胞1次，向每孔中加入100 μl VSV(100$TCID_{50}$／ml)，细胞对照孔加100 μlMEM培养液，继续培养24 h，当病毒生长良好时，用倒置显微镜观察细胞病变(CPE)。IFN效价为呈现50%细胞病变效应孔的最高稀释度的倒数(单位／ml)。

1.5 T、B淋巴细胞的有丝分裂原反应性检测

按Adair(1991)的方法制备脾、法氏囊淋巴细胞悬液，^3H-TdR掺入法测定脾T淋巴细胞ConA反应性和法氏囊B细胞PMA反应性，结果以刺激指数表示。

1.6 外周血 ANAE+、白细胞计数和免疫器官体重比观察

按文献(张凌志，1983)方法进行外周血 ANAE+细胞染色和观察计数，常规方法进行血白细胞分类计数，免疫器官体重比以免疫器官与体重比值×100 表示。

2 结果

2.1 公雏鸡脾淋巴细胞 IL-2、IFN 诱生活性变化

公雏鸡脾淋巴细胞 IL-2、IFN 诱生活性在 75 和 50 mg／kg 组低于正常对照($P<0.01$ 和 $P<0.05$)，25 和 10 mg／kg 组无明显变化($P>0.05$)。连续 3 天阻断 GR 组的 IL-2、IFN 诱生活性低于同剂量 RU_{486} 阻断 GR1 天组($P<0.05$)。以脾淋巴细胞 IL-2、IFN 诱生活性为变量，分别对 RU_{486} 剂量作直线回归分析，相关系数分别为：$R_{IL-2}=-0.9880$，$R_{IFN}=-0.9557$，$P<0.05$。IL-2、IFN 诱生活性与 RU_{486} 剂量呈负相关，结果见表 2。

2.2 公雏鸡 T、B 淋巴细胞的有丝分裂原反应性变化

公雏鸡 T、B 淋巴细胞有丝分裂原反应性在 RU_{486} 75 和 50 mg／kg 组降低($P<0.01$)，25 和 10 mg／kg 组无明显变化($P>0.05$)。连续 3 天阻断 GR 鸡的 T、B 淋巴细胞有丝分裂原反应性低于正常对照鸡($P<0.01$)，和同剂量 RU_{486} 阻断 GR1 天鸡比较呈进一步降低，但 $P>0.05$。以 T、B 淋巴细胞受有丝分裂原刺激后的转化指数为变量，分别对 RU_{486} 注射剂量作直线回归分析，相关系数分别为：$R_T=-0.9457$，$R_B=-0.8975$，$P<0.05$，T、B 淋巴细胞转化指数与 RU_{486} 剂量呈负相关，结果见表 2。

表 2　公雏鸡脾淋巴细胞 IL-2、IFN 诱生活性和 T、B 淋巴细胞有丝分裂原反应性变化

Table 2　The IL-2, IFN inductive activity of T cells and proliferative activity of T, B lymphocytes in cocks treated with RU_{486}

分组	n	RU_{486} (mg／kg)	IL-2 (IU／ml)	IFN (IU／ml)	T 淋巴细胞 (SI)	B 淋巴细胞 (SI)
Ⅰ	15	75	1622±461	4.02±0.26	1.79±0.42	1.81±0.37
Ⅱ$_a$	15	50	1546±724	3.60±0.52	1.68±0.99	1.81±0.39
Ⅱ$_b$	5	0	2445±451	6.17±0.51	4.06±0.98	3.69±0.90
Ⅲ	5	50	1905±398	4.33±0.52	1.89±0.35	1.97±0.50
Ⅳ	5	25	2463±193	6.33±0.52	3.16±0.76	3.59±0.97
Ⅴ	5	10	2645±604	6.67±0.37	3.31±0.52	3.49±0.44
Ⅵ	15	0	2645±453	6.54±0.44	3.35±0.41	3.48±0.58

注：SI为平均刺激指数，Ⅰ、Ⅲ与Ⅵ组$P<0.01$，Ⅱ$_a$与Ⅱ$_b$组 $P<0.01$，Ⅳ、Ⅴ与Ⅵ组$P>0.05$，Ⅱ$_a$与Ⅲ组 $P<0.05$(T、B SI $P>0.05$)。

Notes SI = meaning stimulitive index, Ⅰ Ⅲ vs Ⅵ $P<0.01$, Ⅱ$_a$ vs Ⅱ$_b$ $P<0.01$, Ⅳ Ⅴ vs Ⅵ $P>0.05$, Ⅱ$_a$ vs Ⅲ $P<0.05$(T, B SI $P>0.05$)

2.3 公雏鸡外周血淋巴细胞、ANAE+细胞、单核细胞、异嗜性细胞百分率变化

RU_{486} 75 和 50 mg／kg 阻断 GR24 h 鸡的外周血淋巴细胞、粗颗粒性 ANAE+和单核细胞百分率低于健康对照($P<0.01$)，异嗜性细胞百分率高于正常($P<0.01$)。RU_{486} 25 和 10 mg／kg 阻断 GR24 h 鸡的上述细胞百分率无明显变化($P>0.05$)。连续 3 天阻断 GR 鸡的外周血单核细胞、ANAE+细胞、淋巴细胞百分率低于正常对照($P<0.01$)，和同剂量 RU_{486} 阻断 GR1 天鸡比较，单核细胞、ANAE+细胞百分率进一步降低($P<0.05$)，其余

差异不明显($P>0.05$)，结果见表 3。

表 3 公雏鸡外周血淋巴细胞、ANAE+细胞、单核细胞、异嗜性细胞百分率变化

Table 3 Percentages of lymphocyte, ANAE+cell, monocytes, neutrophil of peripheral blood in cocks treated with RU_{486}

分组	n	淋巴细胞	ANAE+细胞	单核细胞	异嗜性细胞
Ⅰ	10	32.60±3.76	30.40±3.41	8.90±2.46	51.60±2.83
$Ⅱ_a$	10	30.60±7.58	26.70±4.35	9.00±1.58	52.00±8.38
$Ⅱ_b$	5	40.11±4.39	38.40±5.02	11.30±1.94	35.70±4.60
Ⅲ	5	38.80±4.73	30.20±3.56	10.20±1.92	47.40±3.69
Ⅳ	5	42.20±5.20	38.20±2.59	11.90±4.32	34.60±8.08
Ⅴ	5	43.00±5.43	38.40±2.41	12.40±3.52	33.20±4.49
Ⅵ	10	41.80±3.72	39.10±4.67	12.90±2.51	35.70±4.59

注：Ⅰ、Ⅱ与Ⅵ组$P<0.01$，$Ⅱ_a$与$Ⅱ_b$组$P<0.01$，$Ⅱ_a$与Ⅲ组$P<0.05$，Ⅳ、Ⅴ与Ⅵ组$P>0.05$。

Notes Ⅰ Ⅱ vs Ⅵ $P<0.01$，$Ⅱ_a$ vs $Ⅱ_b$ $P<0.01$，$Ⅱ_a$ vs Ⅲ $P<0.05$，Ⅳ Ⅴ vs Ⅵ $P>0.05$.

2.4 公雏鸡免疫器官与体重比值的变化

公雏鸡脾脏、胸腺、法氏囊与体重比值在 RU_{486} 75 和 50 mg／kg 组降低($P<0.01$)，25 和 10 mg／kg 组无明显变化($P>0.05$)。免疫器官体重比下降趋势有 RU_{486} 剂量依赖性，剂量越大，下降越明显。RU_{486} 50 mg／kg 阻断 GR3 天，鸡的免疫器官与体重比明显低于正常($P<0.01$)，与同剂量 RU_{486} 阻断 GR24 h 鸡比较，脾脏无明显变化($P>0.05$)，其余降低($P<0.05$)。

3 讨论

本实验发现，高剂量(>50 mg／kg)RU_{486} 阻断 GR 功能对免疫系统起抑制作用，连续阻断有持续和加重抑制作用，不仅使免疫器官萎缩，而且导致淋巴细胞活性降低，细胞因子产生减少，分子免疫调节障碍。适当剂量（<50 mg／kg)的 RU_{486} 阻断 GR 功能对免疫系统无影响。脾细胞 IL-2、IFN 活性，T、B 细胞的有丝分裂原反应性变化分别与 RU_{486} 剂量呈负相关，提示免疫细胞的功能性 GR 含量与免疫活性呈正相关。关于体内阻断 GR 功能对免疫系统影响的研究还未见报道，GR 与免疫细胞活性的关系说法不一，但 Antonakis (1994)和 Van Voorhis (1989) 认为体外高浓度 RU_{486} 阻断 GR 功能可引起淋巴细胞活性抑制，而适当阻断 GR 则有利于淋巴细胞抵抗 GC 诱导的免疫抑制，这与本实验结果有一致性。本研究结果说明 GR 与免疫功能密切相关，大量阻断 GR 功能对免疫系统有抑制作用，一定数量的功能性 GR 含量可能对免疫细胞活性起支持作用。已有报道，免疫抑制性疾病使淋巴细胞 GR 含量减少，免疫增强则可促进淋巴细胞表达 GR(王水琴等，1995)，本研究从 GR 角度阐明了 GR 功能对免疫系统的影响。

GR 主要介导 GC 对免疫系统起抑制作用，阻断 GR 功能后，免疫细胞活性应升高，本实验结果与理论推测并不完全一致。我们认为，这是体内多种因素共同作用的结果，是机体内分泌免疫平衡失调的表现。GC 的生物效应对机体生长发育、物质代谢、信息传导极为重要，它还对某些对正常生长发育和物质代谢起重要作用的激素起允许作用(朱岩等，1993)。在生理条件下，高剂量 RU_{486} 阻断 GR 可能干扰了免疫细胞的正常代谢活动，使免疫细胞难以活化和导致细胞因子合成减少，因为 GC 对免疫系统的作用不仅是

抑制性的，在某些实验条件下，适当量的 GC 也可增强淋巴细胞的增殖反应。同步实验资料证实，RU_{486}75 和 50 mg／kg 阻断 GR24 h，淋巴细胞 GR 的 GC 结合容量下降 60%以上，而低于 25 mg／kg 的 RU_{486} 阻断 GR24 h，淋巴细胞的 GC 结合容量下降不到 30%，故认为维持免疫细胞的一定功能性 GR 含量对其活性是必须的，GR 功能改变可影响免疫细胞活性。

免疫细胞含有多种神经递质和内分泌激素受体，这些递质和激素对免疫细胞活性起调控作用；免疫细胞也可分泌多种细胞因子、递质和激素，通过对神经系统的反馈调节而维持免疫系统的正常功能(金伯泉，1995)。GR 介导的生物学作用对免疫系统具有广泛影响，是生物进化过程中的一种古老的自稳保护机制。GR 是一种半衰期很短的蛋白质，小鼠脾细胞 GR 的半衰期为 1.6±0.5 h，其合成极易受体内外因素的影响，它可能既作为 GC 作用的桥梁，又作为调节成分，调节着内分泌和免疫之间的平衡和稳定。大量 GR 功能阻断可导致内分泌免疫调节紊乱、免疫功能障碍。有人认为 GR 介导 GC 对免疫细胞的发育分化起调控作用，鼠胸腺的凋亡与 GC-GR 作用有关(Joag，1989)。Compton 等(1990)发现，GR 可介导 GC 作用于鸡胸腺及法氏囊淋巴细胞，引起淋巴细胞 DNA 阶梯式断裂，用 RU_{486} 阻断 GR 功能可阻止 GC 诱导的 DNA 断裂，说明 GR 可能在淋巴细胞分化成熟过程中扮演重要角色。体内内分泌与免疫的相互调节机制极为复杂，GR 维持内分泌免疫平衡的机制值得进一步研究。

参考文献

王水琴，黎　立，王　澜等，1995. 免疫抑制反应对糖皮质激素受体的向下调节. 甘肃畜牧兽医，**122**(3)：8—10.

朱　岩，邱学才，1993. 糖皮质激素"允许作用"的可能机理. 生理科学进展，**24**(3)：263—266.

张志凌，李福生，薛文志，1985. 应用酯酶染色法检测鸡血液T淋巴细胞. 家畜传染病，**22**(1)：37—39.

金伯泉，1995. 细胞和分子免疫学. 西安：世界图书出版公司出版 133—137.

杨贵贞，1993. 免疫生物工程纲要与技术. 长春：吉林科技出版社. 28—51.

周　洁，1995. 糖皮质激素受体的分子结构及细胞内作用模式，国外医学内分泌分册，**15**(2)：66—68.

曾　勇，1993. 糖皮质激素受体与免疫系统的相互关系. 华西医学，**8**(1)：93—95.

Adair B M, McNeilly F, McConnell C D G, 1991. Effects of chicken anemia agent on lymphokine production and lymphocyte transformation in experimentally infected chickens. *Avian Disease*, **35**: 783-792.

Antonakis N, Georgolias V, Margioris A N, 1994. *In vitro* differential effects of the antiglucocorticoid RU_{486} on the release of lymphokines from mitogen-activited normal human lymphocytes. *J. Steroid. Biochem. Miochem. Molec. Biol.*, **51**: 67.

Blalock J E, 1994. The syntaxofimmune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today*, **15**: 504-551.

Compton M M, Gibbs P S, Swecegood L R, 1990. Glucocorticoid mediated activation of DNA degradation, inavian lymphocytes. *Gen Comp. Endocrinol.*, **80**: 68108-68111.

Philibert D, Costerousse G, Gaillard-Moguilewsky M, 1991. From RU_{486} towards disociated antiglucocorticoid and antiprogestertone. *Front Horm Res.*, **19**: 1-17.

Schnetzler M, Dommen A, Nowak J S, 1983. Characterization of T cell growth factor. *Eur. J. Immunol.*, **13**: 560-566.

Van Voorhis B, Anderson D, Hill J, 1989. The effects of RU_{486} on immune function and steroid induced immuno-suppression *in vitro* *J. Clin. Endocr. Metab.*, **69**:11.

THE CORRELATIONS BETWEEN GLUCOCORTICOID RECEPTOR AND IMMUNE FUNCTIONS IN COCK

PAN Xing-hua WANG Shui-qin CHEN Zhi-long

(Laboratory Research Center, Kunming General Hospital of Chendu Military District Kunming 650032)

Abstract

The glucocorticoid receptor (GR) of cocks were partially blocked with 75、50, 25, 10 mg / kg of RU_{486}, an antagonist, for 24 hours and 50 mg / kg of RU_{486} for 72 hours. The immunological changes were studied in the process. The results showed that the IL-2 and IFN inductive activities of lymphocytes, the mitogenic activities of T and B cells, the percentages of lymphocyte, ANAE+cell, monocyte and the ratios of immune organ-to-body weight were greatly reduced ($P< 0.01$) when the GR of chickens were blocked with 75 and 50 mg / kg of RU_{486}. There were no significant changes in adove immune indexes when the GR of cocks were blocked whith 10 and 20 mg / kg of RU_{486}. All the examined immune indexes were lower than those of control ($P< 0.01$) and cocks GR-blocked with 50 mg / (kg · day) of RU_{486} for 72 hours. This indicated that the immune functions of immune system were closely related to the active GR concentration of immune cells in cock, and that greatly blocked GR of cock were resulted in immunossupression. Correlation analyses showed that the immune activities in cocks GR-blocked with RU_{486} were dose dependent. This suggested that the immune functions and active GR content in cock were positively correlated with eath other.

Key words Glucocorticoid receptor, Immunosuppression, Cock, RU_{486}